



Universidade Federal de Santa Catarina

Centro de Ciências Agrárias

Curso de Engenharia de Aquicultura

**Caracterização preliminar dos hemócitos da
perlífera nativa *Pteria hirundo***

Graziela Cleuza Vieira

Florianópolis/SC
2014

Graziela Cleuza Vieira

**Caracterização preliminar dos hemócitos da
perlífera nativa *Pteria hirundo***

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Curso de Engenharia de Aquicultura da
Universidade Federal de Santa Catarina
como pré-requisito para a obtenção do título
de Engenharia de Aquicultura.

Orientador: Dr. Rafael Diego da Rosa

Florianópolis
2014

Cleuza Vieira, Graziela

Caracterização preliminar dos hemócitos da perlífera nativa *Pteria hirundo* / Graziela Cleuza Vieira ; orientador, Dr. Rafael Diego da Rosa - Florianópolis, SC, 2014.

38 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Graduação em Engenharia de Aquicultura.

Inclui referências

1. Engenharia de Aquicultura. 2. *Pteria hirundo*. 3. Sistema imune. 4. hemócitos. 5. Peptídeos antimicrobianos. I. Diego da Rosa, Dr. Rafael. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Engenharia de Aquicultura. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos meus anjos protetores por sempre estarem ao meu lado me guardando e me influenciando a trilhar sempre o caminho do bem.

Aos meus pais, que amo muito, por todo apoio ao longo dos anos, carinho e a educação que me fez ser a pessoa que sou hoje. Em especial, a minha mãe que sempre me apoiou e me mostrou que em momentos difíceis devemos erguer a cabeça e seguir em frente com muito mais firmeza e determinação.

À minha amiga, companheira, colega e irmã Izabela pelo carinho, amor, companheirismo e apoio prestado em todas as fases da minha vida. À minha amada cachorrinha Nina por me proporcionar tanta alegria e por sempre estar junto comigo, principalmente nos momentos de estudo.

Ao Giovane Eidt por tonar-se, em muitos momentos, meu porto seguro e por me proporcionar muito amor, carinho, dedicação e companheirismo nesse tempo todo de convivência. E a sua família pelo carinho e amabilidade para comigo.

Ao Professor Dr. Rafael Diego da Rosa por me aceitar como sua aluna, pela paciência, dedicação a mim e ao meu trabalho, amizade, pelos grandes conselhos, por confiar no meu potencial e por me orientar brilhantemente.

À Professora Dra. Luciane Perazzolo pela confiança, amizade, conversas agradáveis, conselhos, por acreditar no meu potencial, pela oportunidade de trabalhar no LIAA e pela grande dedicação a nós, alunos.

À MSc. Danielle Mello por se dispor a ajudar neste trabalho, além de contribuir brilhantemente na execução dos experimentos.

Aos colegas do LIAA por me acolherem, confiarem em mim e por abrilhantarem meus dias. À Dra. Margherita Barracco por dividir sua grande sabedoria, pelas dicas, opiniões e disposição de sempre ajudar ou sanar qualquer dúvida quando preciso.

Às minhas joaninhas queridas Bibiana Bragio e Josiany Magalhães pela amizade, carinho e por todos os momentos especiais e memoráveis que passamos juntas desde a pré-adolescência. E também à querida Gabriela Lopes pela rica amizade e carinho.

Às minhas amigas químicas Mariana Andrade, Marli Ferreira, Patricia Veronezi, Fernanda Zeferino e Gabriela Sonai pela amizade, pelas risadas e pela bagunça que sempre fazemos quando nos reunimos.

Aos meus amigos George Martins e Robinsom Akishino pelo grande companheirismo, risadas, trilha, comilanças, sushis e afins que sempre acabamos inventando juntos, ao longo dos anos de graduação.

A todos os técnicos, funcionários, alunos e professores do Laboratório de Moluscos Marinhos. Em especial, aos professores Dr. Claudio Manoel Melo e Dr. Jaime Fernando Ferreira que sempre me orientaram da melhor maneira possível e confiaram no meu trabalho no período de estágio no LMM.

Ao Itamar Goulart pela amizade, grande aprendizagem, pescarias, risadas e dias muito agradáveis no Sambaqui.

Ao grupo do projeto polvo: Tiê, Fred, Isis e em especial à Penélope pela amizade, cumplicidade, companheirismo, confiança, incentivo e auxílio sempre que necessário.

Ao Professor Dr. Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque por ceder gentilmente os animais para este estudo, além de sempre estar a disposição para sanar qualquer dúvida a respeito da *Pteria hirundo*.

Ao Professor Giordano Calloni por disponibilizar os equipamentos para a obtenção das fotos das células e à querida Michelle Rode pela prestatividade e grande auxílio com a microspia.

À UFSC por me proporcionar um ensino público e de qualidade. Em especial, ao Departamento de Aquicultura, a todos os professores que participaram da minha formação e à querida Jussara que muitas vezes “salvou a minha vida”.

A todos que não foram mencionados mas, que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento como ser humano e amadurecimento ao longo da minha vida.

Muito obrigada a todos...

*“O futuro pertence àqueles que acreditam
na beleza de seus sonhos.”*

(Eleanor Roosevelt)

RESUMO

A ostra perlífera nativa *Pteria hirundo* possui um grande potencial para a aquicultura nacional devido a sua capacidade de produzir pérolas. Apesar do seu interesse econômico, nada ainda se conhece a respeito do seu sistema imune. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo preliminar das células imunes ou hemócitos (células circulantes da hemolinfa) dessa espécie, a fim de se conhecer melhor o seu sistema imunológico. Através de microscopia de luz, foi possível identificar, caracterizar e quantificar as populações de hemócitos presentes na hemolinfa. Os hemócitos de *P. hirundo* são semelhantes aos encontrados em outros moluscos bivalves. Foram identificados dois tipos principais de células: hemócitos com grânulos citoplasmáticos (hemócitos granulares ou HG) e hemócitos sem grânulos (hemócitos hialinos ou HH). Através de ensaios *in vitro* com microesferas fluorescentes de látex (2 µm de diâmetro), foi possível confirmar que os hemócitos apresentam capacidade fagocítica. Por meio da técnica de imunofluorescência indireta, não foi possível detectar a presença do peptídeo antimicrobiano mitilina nas células circulantes de *P. hirundo*. A participação dos hemócitos nas respostas de defesa imune foi avaliada 24 h após um estímulo microbiano com a bactéria marinha *Vibrio harveyi*. Apesar de não terem sido encontradas diferenças estatísticas na concentração total de hemócitos, a proporção de HG circulantes nos animais estimulados com *V. harveyi* e com salina foi 15,5 % maior do que em animais não estimulados. O presente estudo é de grande importância para o conhecimento de alguns aspectos do sistema imunológico da ostra perlífera nativa *P. hirundo*, podendo contribuir para a prevenção e controle de enfermidades nos cultivos.

Palavras-chave: *Pteria hirundo*, sistema imune, hemócitos, peptídeos antimicrobianos.

ABSTRACT

The indigenous pearl oyster *Pteria hirundo* has a great potential in aquaculture due to its capacity to produce pearls. Despite of its economic importance, little is known about its immune system. In this context, the aim of this study was to basically characterize the immune cells or hemocytes (circulating cells of the hemolymph) of this species, in order to increase the knowledge of its immune system. By using light microscopy, it was possible to identify, characterize and quantify the hemocyte populations found in the hemolymph. The pearl oyster hemocytes are similar to those found in other bivalve molluscs. Two main types of hemocytes were identified: cells with cytoplasmatic granules (granular hemocytes or HG) and agranular cells (hyaline hemocytes or HH). Through *in vitro* assays with fluorescent latex microspheres (2 µm diameter), it was possible to confirm the phagocytic capacity of these cells. Using immunofluorescence, it was not possible to detect the presence of the antimicrobial peptide mytilin in the circulating cells of *P. hirundo*. The involvement of hemocytes in the immune defense responses was evaluated at 24 hours after a microbial challenge with the marine Gram-negative bacterium *Vibrio harveyi*. Although no differences were found in the concentration of hemocytes, the proportion of circulating HG in animals stimulated with *V. harveyi* or saline was 15,5 % higher than in non-stimulated animals. The present study is of particular importance for the knowledge of some aspects of the immune system of the indigenous pearl oyster *P. hirundo*, which can contribute to prevention and control of diseases in cultured animals.

Key words: *Pteria hirundo*, immune system, hemocytes, antimicrobial peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1

Vista (A) externa e (B) interna das valvas de um indivíduo adulto da espécie *Pteria hirundo* (Fotos da autora).

13

Figura 2

Estrutura tridimensional da (A) defensina da ostra *Crassostrea gigas* (PDB: 2B68) e da (B) mitilina do mexilhão *Mytilus galloprovincialis* (PDB: 2EEM). Ambos peptídeos apresentam uma estrutura do tipo CS $\alpha\beta$, composta por uma α -hélice conectada a duas folhas β pregueadas antiparalelas estabilizadas por pontes de dissulfeto (Adaptado de Scmitt et al., 2012; Roch et al., 2008).

17

Figura 3

Número de hemócitos circulantes na hemolinfa de diferentes espécies de moluscos. O nome das espécies (com a indicação das famílias) está representado à direita da figura: *Pteria hirundo*, *Pinctada fucata* (Dang et al., 2012), *Crassostrea rhizophorae* (Barth et al., 2003), *C. gasar* (Queiroga et al., 2013), *C. gigas* (Zhang et al., 2014), *Saccostrea glomerata* (Dang et al., 2014), *Nodipecten nodosus* (Schleder et al., 2008), *Argopecten irradians* (Zhang et al., 2006), *Chlamys farreri* (Liu et al., 2004), *Mytilus edulis* (Coles et al., 1995), *Perna perna* (Barracco et al., 1999), *Venerupis (Ruditapes) philippinarum* (Oubella et al., 1996), *Macrocallista nimbosa* (Jauzein et al., 2013) e *Octopus vulgaris* (Castellanos-Martínez et al., 2014). O dendograma à esquerda indica a relação filogenética entre as espécies (Plazzi et al., 2011).

26

Figura 4

Hemócitos circulantes presentes na hemolinfa da ostra perliífera *Pteria hirundo*. (A-C) Hemócitos granulares e (D-E) hemócitos hialinos corados com Giemsa. (F) Núcleo dos hemócitos marcados na cor azul com o intercalante DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) e citoesqueleto (actina-F) marcado na cor vermelha com faloidina conjugada com Alexa Fluor® 568. A barra corresponde a 5 μ m.

28

Figura 5

Ensaio de fagocitose dos hemócitos de *Pteria hirundo* com microesferas de látex fluorescentes. (A) A coloração em azul corresponde ao núcleo dos hemócitos marcados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). (B) A coloração em verde corresponde às microesferas de látex fluorescentes (2 µm de diâmetro) fagocitadas pelos hemócitos. A barra corresponde a 5 µm.

29

Figura 6

Detecção de mitilinas nos hemócitos da perlífera nativa *Pteria hirundo* por imunofluorescência indireta. (A) Hemócitos de *P. hirundo* e da (C) ostra *Crassostrea gigas* incubados com anticorpos policlonais anti-mitilina B de *Mytilus galloprovincialis*. Os controles negativos foram realizados na ausência dos anticorpos primários em preparações de hemócitos de (B) *P. hirundo* e (D) *C. gigas*. A coloração em verde corresponde à marcação de mitilinas enquanto que a coloração em azul corresponde ao núcleo dos hemócitos marcados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). A barra corresponde a 5 µm.

31

Figura 7

Contagem total (THC) e diferencial (DHC) dos hemócitos de *Pteria hirundo* 24 horas após a injeção de PBS-salina (grupo Salina) ou após a injeção de uma solução contendo bactérias *Vibrio harveyi* ATCC 14126 mortas por calor (grupo Estimulado). Animais não-injetados foram utilizados como grupo Controle. (A) Os pontos representam a THC dos diferentes indivíduos (n=12) de cada grupo experimental e as linhas em vermelho a média. (B) As barras representam a média da porcentagem de hemócitos granulares (preto) e hialinos (branco) de cada grupo experimental. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre as condições experimentais ($P < 0,05$), obtidas através dos testes ANOVA e Tukey.

32

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus Celsius
‰	partes por mil
×g	força gravitacional
Da	Dalton
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DO	densidade óptica
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
FITC	isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>)
g	grama
G	unidade Gauge
h	hora
L	litro
LB	meio Luria-Bertani (<i>Lysogeny Broth</i>)
m	metro
M	Molar
MAS	Solução de Alsever modificada (<i>Modified Alsever Solution</i>)
min	minuto
n	número
PAM	peptídeo antimicrobiano
PBS	tampão fosfato salina (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
pH	potencial de hidrogênio
v	volume

SUMÁRIO

Resumo	06
Abstract	07
Lista de Figuras	08
Lista de símbolos, abreviaturas e siglas	10
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Alguns aspectos relacionados ao cultivo de moluscos bivalves	12
1.2. A perlífera nativa <i>Pteria hirundo</i>	13
1.3. Sistema imune dos moluscos bivalves	14
1.4. Proteínas e peptídeos antimicrobianos	16
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Animais	20
3.2. Estímulo microbiano	20
3.3. Coleta de hemolinfa	21
3.4. Caracterização dos hemócitos	21
3.4.1. Microscopia de contraste de fase	21
3.4.2. Coloração de Giemsa	22
3.4.3. Microscopia de fluorescência	22
3.5. Hemogramas	23
3.5.1. Contagem total de hemócitos (THC)	23
3.5.2. Contagem diferencial de hemócitos (DHC)	23
3.6. Ensaio de fagocitose	23
3.7. Imunofluorescência indireta	24
3.8. Análise estatística	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Caracterização dos hemócitos da perlífera <i>P. hirundo</i>	26
4.2. Os hemócitos de <i>P. hirundo</i> possuem capacidade fagocítica ...	29
4.3. Peptídeos antimicrobianos do tipo CS $\alpha\beta$ (mitilinas e defensinas) parecem não estar presentes nos hemócitos de <i>P. hirundo</i>	30
4.4. Resposta dos hemócitos a um estímulo microbiano	31
5. CONCLUSÕES	33
Referências	34

1. INTRODUÇÃO

1.1. Alguns aspectos relacionados ao cultivo de moluscos bivalves

A aquicultura mundial vem crescendo consideravelmente nos últimos anos. A produção aquícola desempenha um papel social e econômico de grande relevância por meio da produção alimentícia e geração de empregos e renda. Em 2010, a produção mundial de pescados alcançou um volume total de 59,9 milhões de toneladas, movimentando aproximadamente 119.400 milhões de dólares (FAO, 2012). O Brasil está entre os dez maiores países produtores de pescados das Américas, alcançando em 2010 um volume total de produção de 479.399 toneladas (FAO, 2012). A maricultura nacional baseia-se principalmente na produção de crustáceos (carcinicultura) e de moluscos bivalves (malacocultura) (MPA, 2011).

Diversos estados, ao longo da costa brasileira, têm implantado o cultivo de moluscos bivalves. O Estado de Santa Catarina se destaca como o principal produtor de moluscos cultivados no país, sendo responsável por cerca de 90 % da produção nacional de ostras e mexilhões. Em 2011, a produção total de moluscos bivalves no Estado de Santa Catarina foi de 18.254 toneladas, sendo que os municípios da grande Florianópolis foram responsáveis por 96 % desse montante (MPA, 2011). Entre as espécies cultivadas, destacam-se a ostra *Crassostrea gigas*, o mexilhão *Perna perna* e a vieira *Nodipecten nodosus*.

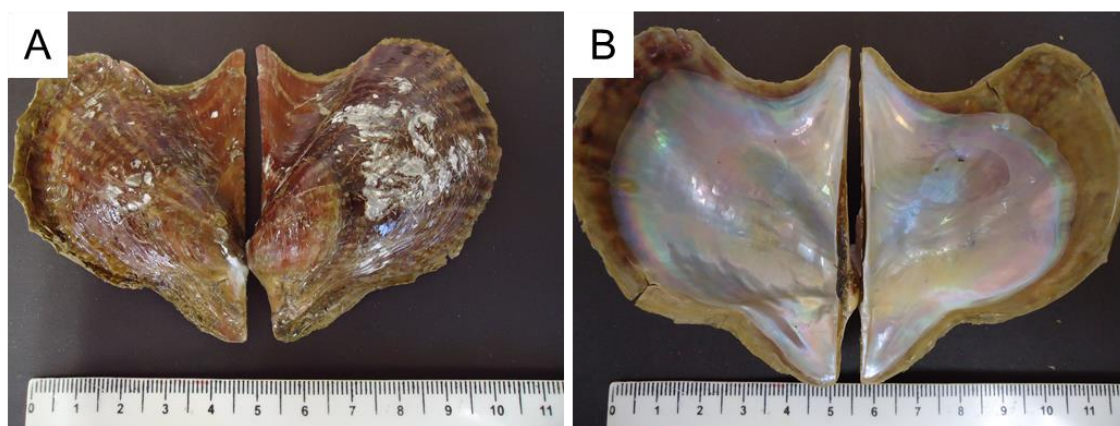
Apesar da ampla diversidade de moluscos marinhos encontrados no Brasil, o cultivo de moluscos restringe-se basicamente às espécies comestíveis. No entanto, algumas espécies podem oferecer um valor comercial ainda maior do que o seu uso restrito ao consumo humano, como no caso das espécies perliíferas. Além de serem comestíveis, alguns moluscos da família Pteriidae possuem a capacidade de produzir pérolas o que faz aumentar seu interesse para aquicultura (URBAN, 2000). No litoral brasileiro, foram identificadas pelo menos duas espécies da família Pteriidae, *Pinctada imbricata* e *Pteria hirundo*. Considerando o desenvolvimento da aquicultura e a busca por novas espécies para o cultivo, essas se destacam como uma interessante opção devido a sua capacidade de produzir pérolas (Albuquerque et al., 2012).

1.2. A ostra perlífera *Pteria hirundo*

As ostras perlíferas da família Pteriidae são representadas principalmente por dois gêneros: *Pteria* e *Pinctada*. Esses bivalves possuem um grande valor econômico, devido a sua capacidade de produzir pérolas, como demonstrado em outros países. Segundo Fassler (1995), os maiores produtores de pérolas estão no Japão, China, Sul do Pacífico e Sudeste da Ásia. Entre as espécies mais cultivadas no mundo estão a *Pinctada maxima*, *Pinctada margaritifera*, *Pinctada martensi*, *Pteria penguin* e *Pteria sterna*.

Entre as ostras perlíferas com potencialidade de cultivo no Brasil está a espécie *P. hirundo*, também conhecida como ostra alada do Atlântico (“*Atlantic Wing Oyster*”) ou laripeba (Albuquerque et al., 2012). Essa espécie é encontrada na bibliografia com as sinonímias *P. colymbus* (Rödingen, 1798) e *P. atlantica* (Lamarck, 1819) (Abbott, 1974; Rios, 2009). Essa ostra perlífera ocorre desde a América do Norte até o Brasil, incluindo ainda o oeste da Índia. Em seu ambiente natural, *P. hirundo* é encontrada em profundidades que variam de 20 a 150 m. Essa perlífera possui uma coloração que vai do marrom ao avermelhado (**Figura 1**) e produz um bisso resistente. Ela é ainda caracterizada pelo formato ovalado das valvas e a presença de aurículas, onde a posterior apresenta um prolongamento em forma de asa (Rios, 2009 *apud* Albuquerque et al. 2012).

Figura 1. Vista (A) externa e (B) interna das valvas de um indivíduo adulto da espécie *Pteria hirundo*.



Apesar de não ser uma característica exclusiva dos pterídeos, a ocorrência de pérolas nessas espécies é bastante frequente. A pérola se forma em resposta a fatores externos, como resíduos ou grãos de areia que entram na concha. Existem dois tipos de pérolas: (i) a pérola ampolada, também chamada meia-pérola, que é uma protrusão da superfície interna da concha da ostra e (ii) a pérola encistada, formada ao redor do núcleo, dentro do corpo do molusco (Nagai, 2013). A pérola é uma concreção densa e brilhante, que consiste em uma pequena partícula rodeada por camadas concêntricas de nácar, composta por conchiolina ($C_{32}H_{48}N_9O_{11}$), carbonato de cálcio na forma de aragonita ($CaCO_3$) e água (Nagai, 2013). Espécies do gênero *Pteria*, como *P. hirundo*, possuem a capacidade de produzir pérolas do tipo ampolada. Além de produzir pérolas, a carne de *P. hirundo* pode ser também utilizada para consumo humano, o que faz aumentar ainda mais o seu interesse para a aquicultura (Albuquerque, 2010).

Apesar do grande potencial das ostras perlíferas para a aquicultura nacional, não há relatos de cultivo comercial de nenhum pterídeo no Brasil. O Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), pertencente ao Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, vem estudando a *P. hirundo* desde meados dos anos 2000, assim que se observou a presença desses animais nas estruturas de cultivo (cordas de mexilhões) (Alves, 2010; Albuquerque, 2010). Resultados oriundos do LMM mostraram que essa espécie apresenta uma alta taxa de crescimento e sobrevivência em cultivo (Albuquerque et al., 2012), confirmando seu potencial zootécnico.

1.3. Sistema imune dos moluscos bivalves

Os moluscos bivalves precisam filtrar diariamente grandes volumes de água para a sua respiração e nutrição. Em consequência, esses animais estão constantemente expostos a uma grande variedade de microrganismos, incluindo muitas espécies patogênicas. Para combater e controlar infecções, os moluscos contam com eficientes mecanismos externos e internos de defesa (Vargas-Albores & Barracco, 2001; Barracco & da Silva, 2008; Schmitt et al., 2012;). A primeira linha de defesa é conferida pela concha e pela produção de

muco, que servem como barreiras físico-químicas. Quando essas barreiras são ultrapassadas, diferentes reações imunológicas são então desencadeadas com o objetivo de eliminar os agentes invasores (Barracco & da Silva, 2008).

Os moluscos bivalves, assim como outros invertebrados, possuem apenas um sistema imunológico do tipo inato, não possuindo uma imunidade do tipo adaptativa como ocorre nos vertebrados mandibulados (Schmitt et al., 2012). Assim, esses animais são desprovidos de células da linhagem linfocítica, as quais são responsáveis pela produção de anticorpos e por memória imunológica baseada em linfócitos. Apesar da ausência de respostas adaptativas de defesa, o sistema imunológico dos moluscos é altamente complexo e envolve tanto reações dos próprios organismos quanto das comunidades microbianas endobiontes a eles associadas (Schmitt et al., 2012).

Os moluscos bivalves possuem um sistema circulatório semiaberto, onde a hemolinfa (correspondente ao sangue dos vertebrados) flui entre os diferentes tecidos (Bachère et al., 2004). A hemolinfa é composta por uma fração celular, representada pelas células circulantes ou hemócitos, e por uma fração líquida constituída pelo plasma (Barracco & da Silva, 2008). Os hemócitos são as células imunocompetentes e também os “fagócitos profissionais” dos moluscos, os quais são capazes de produzir uma grande quantidade de efetores imunológicos (Schmitt et al., 2012).

De acordo com a classificação de Cheng (1981) e Hine (1999), os hemócitos de moluscos bivalves são usualmente subdivididos em duas grandes categorias celulares: hemócitos granulares e hialinos. Os **hemócitos granulares** (HG) apresentam grânulos citoplasmáticos de tamanho variado, onde estão armazenados diferentes efetores do sistema imune (Schmitt et al., 2012). Os **hemócitos hialinos** (HH), por sua vez, apresentam de poucos a nenhum grânulo e são subdivididos em duas classes: (i) células indiferenciadas ou blásticas, com uma alta relação núcleo/citoplasma e (ii) células basófilas maiores, semelhantes a macrófagos. Durante uma infecção, os hemócitos migram massivamente para os locais de injúria, onde realizam a fagocitose dos agentes invasores. No caso de parasitas maiores (como fungos e metazoários), os hemócitos se depositam em várias camadas em volta desse agente invasor, formando cápsulas celulares, onde o parasita aprisionado é posteriormente

destruído (Barracco & da Silva, 2008).

A eliminação dos agentes invasores ocorre através da ativação de mecanismos de defesa que englobam tanto respostas celulares (mediadas pelos hemócitos) quanto respostas humorais (mediadas pelas moléculas imunológicas dissolvidas no plasma). Entre os principais mecanismos de defesa reconhecidos em moluscos bivalves estão: (i) reconhecimento do não-próprio por receptores presentes na superfície dos hemócitos ou solúveis no plasma, (ii) ativação e sinalização dos hemócitos, (iii) produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) e (iv) síntese de proteínas e peptídeos antimicrobianos (PAM) (Schmitt et al., 2012; Bachère et al., 2004).

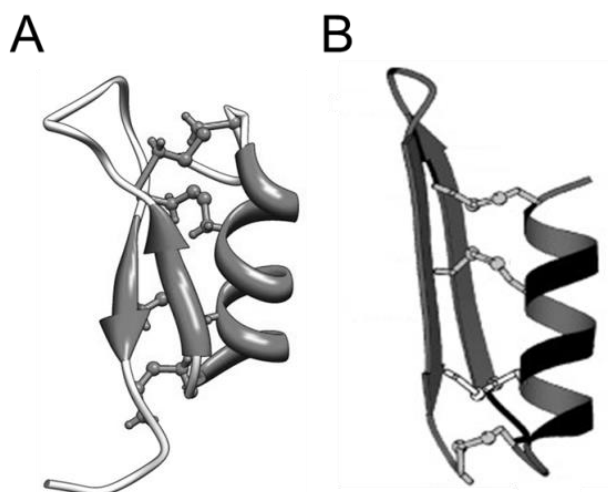
1.4. Proteínas e peptídeos antimicrobianos

As proteínas e peptídeos antimicrobianos (PAM) são componentes essenciais do sistema imune inato e estão amplamente distribuídos entre os diferentes Reinos dos seres vivos. Essas moléculas podem apresentar uma atividade microbicida rápida e potente contra um extenso espectro de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, protozoários e muitos vírus (Guaní-Guerra et al., 2010). Os PAM são classicamente descritos como moléculas anfipáticas e de baixo peso molecular (<10 kDa). Sua característica anfipática (uma região catiônica e uma região hidrofóbica) facilita a sua interação e inserção nos fosfolipídeos aniônicos presentes na membrana externa dos microrganismos (Rosa & Barracco, 2010; Yount et al., 2006). Ao interagirem com a membrana, os PAM podem nela se inserir, formando grandes poros por onde há extravasamento do conteúdo citoplasmático bacteriano. Além disso, os PAM podem ainda apresentar uma atividade detergente ou ainda interferir em diferentes vias metabólicas, causando a morte do microrganismo (Guaní-Guerra et al., 2010).

Até o presente momento, oito famílias de PAM foram identificadas em moluscos bivalves (Li et al., 2011). Entre elas, os PAM melhor caracterizados são os ricos em cisteína da família das defensinas e das mitilinas. As **defensinas** foram os primeiros PAM identificados em moluscos, as quais foram inicialmente purificadas a partir da hemolinfa do mexilhão *Mytilus edulis*

(Charlet et al. 1996). Além dos mexilhões (Charlet et al. 1996; Hubert et al., 1996; Mitta et al., 1999; Xu & Faisal, 2010), as defensinas foram descritas também em outras espécies de bivalves, como ostras (Gueguen et al., 2006; Seo et al., 2005), amêijoas (Adhya et al., 2012) e no bivalve dulcícola *Hyriopsis cumingii* (Ren et al., 2011). As defensinas são peptídeos catiônicos, ricos em resíduos de cisteína e que apresentam uma estrutura do tipo CS $\alpha\beta$, composta por uma α -hélice conectada a duas folhas β pregueadas antiparalelas estabilizadas por pontes de dissulfeto (**Figura 2A**). Elas apresentam atividade principalmente contra bactérias Gram-positivas e fungos filamentosos. Além das defensinas, as **mitilinas** também são peptídeos catiônicos ricos em resíduos de cisteína e que apresentam uma estrutura do tipo CS $\alpha\beta$ (Roch et al., 2008; Mitta et al., 2000) (**Figura 2B**). No entanto, esse PAM foi descrito unicamente em mexilhões e apresenta um espectro de atividade maior do que as defensinas, incluindo bactérias Gram-negativas e algumas espécies de *Vibrio* (Mitta et al., 2000).

Figura 2. Estrutura tridimensional da (A) defensina da ostra *Crassostrea gigas* (PDB: 2B68) e da (B) mitilina do mexilão *Mytilus galloprovincialis* (PDB: 2EEM). Ambos peptídeos apresentam uma estrutura do tipo CS $\alpha\beta$, composta por uma α -hélice conectada a duas folhas β pregueadas antiparalelas estabilizadas por pontes de dissulfeto.



Fonte: adaptado de Scmitt et al., 2012; Roch et al., 2008.

De uma maneira geral, pouco ainda se conhece a respeito do sistema imune de pterídeos, apesar do seu grande potencial para a aquicultura. Assim, o estudo do sistema imune de ostras perlíferas aumentará o nosso conhecimento a respeito da biologia dessas espécies, o que é ainda muito negligenciado. Haja vista o potencial zootécnico e de produção aquícola das ostras perlíferas (Albuquerque et al., 2012), uma maior compreensão dos aspectos imunológicos dessas espécies poderá fornecer subsídios importantes para a prevenção e controle de enfermidades nas larviculturas e nos cultivos. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar os hemócitos da perlífera nativa *P. hirundo*, de maneira a fornecer as primeiras informações sobre os aspectos imunológicos dessa espécie, contribuindo para viabilizar o cultivo de perlíferas em Santa Catarina.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi realizar um estudo preliminar dos hemócitos (células circulantes da hemolinfa) da perlífera nativa *Pteria hirundo*.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar, caracterizar e quantificar os hemócitos da perlífera *P. hirundo*;
- Avaliar a capacidade fagocítica dos hemócitos;
- Detectar a presença do peptídeo antimicrobiano mitilina nos hemócitos;
- Determinar os hemogramas (contagem total e diferencial de hemócitos) de animais submetidos ou não a um estímulo microbiano.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 40 indivíduos adultos da espécie *Pteria hirundo* (Linnaeus, 1758), medindo entre 42 e 63 mm de altura e com o peso médio de $31 \pm 8,7$ g (com concha). Os animais, designados neste estudo como “perlíferas”, foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque do Laboratório de Moluscos Marinhos (UFSC/CCA/AQI). Após coletados, todos os animais foram imediatamente transferidos para o Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (UFSC/CCB/BEG), onde foram acondicionados em aquários 35 de litros, contendo água do mar filtrada (32-34 ‰), mantidos sob aeração constante e à temperatura controlada de 23 ± 4 °C. Os animais foram aclimatados por quatro dias, sem alimentação e com troca regular de água (uma vez ao dia) até serem utilizados nos experimentos.

3.2. Estímulo microbiano

Para os ensaios de estímulo microbiano, foi utilizada a bactéria marinha Gram-negativa *Vibrio harveyi* ATCC 14126 (= LMG 4044). A cultura de *V. harveyi* foi realizada em meio LB-NaCl (10 % peptona, 0,5 % extrato de levedura, 30 % NaCl, pH 7,2) a 20 ± 2 °C por período de 16 h sob agitação (150 rpm). No dia seguinte, a cultura bacteriana foi centrifugada (1.000 ×g por 10 min) e suspendida em PBS (Laborclin®) acrescido de 2,1 % de NaCl (pH 7,2) e denominado neste trabalho de “PBS-salina”. A concentração bacteriana foi então ajustada a uma densidade óptica (DO_{600nm}) de 1, utilizando-se um espectrofotômetro (WPA®). Posteriormente, a solução bacteriana foi finalmente aquecida a 70 °C por 15 min para a inativação das bactérias.

O estímulo bacteriano foi realizado através da injeção de 100 µL da suspensão bacteriana inativada no músculo adutor de 12 animais, segundo protocolo adaptado de Duperthuy e colaboradores (2010). Para isso, os animais foram mantidos fora da água por aproximadamente 20 min para a

abertura total das valvas. Após esse período, foi introduzido entre as valvas um utensílio de plástico para mantê-las abertas durante a injeção. Animais não estimulados (n=12) e animais injetados com o mesmo volume de PBS-salina (n=12) foram utilizados como controle. Os diferentes grupos foram então separados de acordo com o tratamento, devolvidos aos aquários e analisados após 24 h.

3.3. Coleta de hemolinfa

Para os hemogramas e ensaios de atividade fagocítica, a hemolinfa foi individualmente extraída diretamente do músculo adutor, utilizando uma seringa estéril resfriada a 0°C de 1 mL com agulha de 21G. As amostras destinadas aos hemogramas foram separadas individualmente, de acordo com o tratamento, e conservadas em solução antiagregante (Solução de Alsever Modificada ou MAS: 27 mM citrato de sódio, 336 mM cloreto de sódio, 115 mM glicose, 9 mM EDTA, pH 7,2) acrescida de 4 % de formaldeído (1:2, hemolinfa:MAS-formol). Para a avaliação da atividade fagocítica, amostras individuais de hemolinfa de 4 animais não estimulados foram reunidas num único conjunto de amostras e processadas conforme descrito no item 3.6.

Para os ensaios de imunofluorescência indireta, coloração de Giemsa e marcação fluorescente, a hemolinfa foi coletada na forma de um único conjunto de amostras (n=4) na presença de MAS (1:2, hemolinfa:MAS), conforme descrito acima. A solução celular foi lavada duas vezes em MAS (800 xg por 10 min a 4 °C) antes de ser processada.

3.4. Caracterização dos tipos de hemócitos

3.4.1. Microscopia de contraste de fase

As amostras contendo hemócitos fixados foram depositadas em finas camadas, entre lâmina e lamínula, e visualizadas ao microscópio de contraste de fase para observação e identificação dos tipos celulares (aumento de 1.000x). Além disso, o diâmetro das células (em µm) foi determinado pela

extensão de uma régua ocular micrométrica acoplada à ocular de 10x.

3.4.2 Coloração de Giemsa

Amostras de hemolinfa (contendo 10^5 células) coletadas em MAS foram espalhadas sobre lamínulas de 22x22 mm estéreis contendo cloreto de cálcio (CaCl_2) na concentração final de 20 mM e incubadas por 20 min à temperatura ambiente para a adesão celular. Após adesão, as monocamadas celulares foram fixadas com metanol por 10 min e lavadas 2x em água destilada. Em seguida, os hemócitos foram corados com uma solução de Giemsa em PBS (1:6, v:v) durante 15 min e lavados em água destilada. Após secas, as lâminas foram observadas ao microscópio óptico de luz (aumento de 1.000x) e fotografadas quando oportuno.

3.4.3 Microscopia de fluorescência

Amostras de hemolinfa (contendo 10^5 células) coletadas em MAS foram espalhadas sobre lamínulas de 22x22 mm estéreis contendo CaCl_2 na concentração final de 20 mM e incubadas por 20 min à temperatura ambiente para a adesão celular. Após adesão, as monocamadas celulares foram fixadas com uma solução de MAS contendo 4 % de paraformaldeído por 15 min e lavadas 3x em tampão PBS. Em seguida, os hemócitos foram incubados no escuro por 15 min com tampão PBS contendo 0,0001 mg/mL de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), para a marcação fluorescente do núcleo na cor azul, e faloidina conjugada com *Alexa Fluor*[®] 568 (1:500), para marcação fluorescente do citoesqueleto (actina-F) na cor vermelha. As lamínulas foram observadas ao microscópio invertido de fluorescência no Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual (UFSC/CCB/BEG) e fotografada quando oportuno.

3.5 Hemogramas

3.5.1. Contagem total de hemócitos (THC)

A contagem total de hemócitos (*Total Hemocyte Count* ou THC) foi estimada em câmara de Neubauer, a partir das amostras individuais de hemócitos fixados em MAS-formol de animais saudáveis, conforme protocolo padronizado para a contagem de leucócitos humanos (Beçak e Paulete 1976).

3.5.2. Contagem diferencial de hemócitos (DHC)

A contagem diferencial de hemócitos (*Differential Hemocyte Count* ou DHC) foi realizada em microscopia de contraste de fase (aumento de 1.000×), a partir de cinco amostras de cada grupo experimental. A porcentagem relativa dos hemócitos granulares e hialinos foi determinada contando-se aleatoriamente 100 células por lâmina (Schleder et al., 2008).

3.6. Ensaios de fagocitose

Para a avaliação da capacidade fagocítica, uma amostra de hemolinfa contendo 2×10^5 hemócitos de um único conjunto de amostras de 4 animais foi diluída em água do mar estéril (1:2, hemolinfa:água do mar) e incubada por 1 h a 20 °C com $1,7 \times 10^8$ microesferas fluorescentes de látex (485 nm de emissão - cor amarelo/verde) de 2 µm de diâmetro (Polysciences®). Após esse período, as amostras foram fixadas em MAS-formol 4 % (1:2, hemolinfa:MAS-formol). Após fixadas, as amostras foram incubadas por 10 min com tampão PBS contendo 0,0001 mg/mL de DAPI para a marcação fluorescente do núcleo dos hemócitos na cor azul. As amostras de hemolinfa fixadas foram então depositadas em finas camadas, entre lâmina e lamínula, e visualizadas ao microscópio de fluorescência.

3.7. Imunofluorescência indireta

A detecção do peptídeo antimicrobiano mitilina nos hemócitos de *P. hirundo* foi realizada de acordo com o método descrito por Mitta e colaboradores (2000). Amostras de hemolinfa (contendo 10^5 células) coletadas em MAS foram espalhadas sobre lamínulas de 22x22 mm estéreis contendo CaCl_2 na concentração final de 20 mM. As células foram incubadas por 20 min à temperatura ambiente para permitir a adesão celular. Após adesão, as monocamadas celulares foram fixadas com uma solução de MAS contendo 4% de paraformaldeído por 15 min e lavadas 3x em tampão PBS.

A presença de mitilinas nos hemócitos foi avaliada utilizando-se anticorpos policlonais anti-mitilina B de *Mytilus galloprovincialis* (Mitta et al., 2000), produzidos em coelho e gentilmente cedidos pela Dra. Evelyne Bachère da *Université Montpellier 2* (França). Para tal, as monocamadas de hemócitos foram inicialmente permeabilizados com solução de permeabilização (0,2 % gelatina, 0,5 % Triton X-100, 50 mM cloreto de amônio em PBS, pH 7,2) por 30 min e lavadas 3x com solução de lavagem (0,1 % de Tween-20 em PBS, pH 7,2). Em seguida, as monocamadas foram incubadas com solução de bloqueio (5 % de leite em pó desnatado em solução de lavagem) por período de 16 h a 4°C.

As monocamadas foram incubadas com 100 µL do anticorpo anti-mitilina B (30 µg/mL final) por 90 min à temperatura ambiente. Após lavagem, as monocamadas foram incubadas durante 15 min em câmara úmida escura com anticorpos secundários anti-coelho (produzidos em cabra) conjugados com FITC (*fluorescein isothiocyanate*) (521 nm de emissão - cor verde) diluídos 1:300 em uma solução contendo 0,0001 mg/mL de DAPI (marcação do núcleo na cor azul) e 0,003 % do corante Azul de Evans (Sigma®) para diminuir a autofluorescência natural das células. As lamínulas foram observadas ao microscópio invertido de fluorescência no Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual (UFSC/CCB/BEG). Os controles negativos foram realizados na ausência dos anticorpos primários anti-mitilina B. Como controle positivo, foram utilizadas células da ostra *C. gigas*, as quais foram preparadas segundo o protocolo acima descrito para *P. hirundo*. Todos os ensaios de

imunofluorescência indireta foram realizados em duplicata.

3.8. Análise estatística

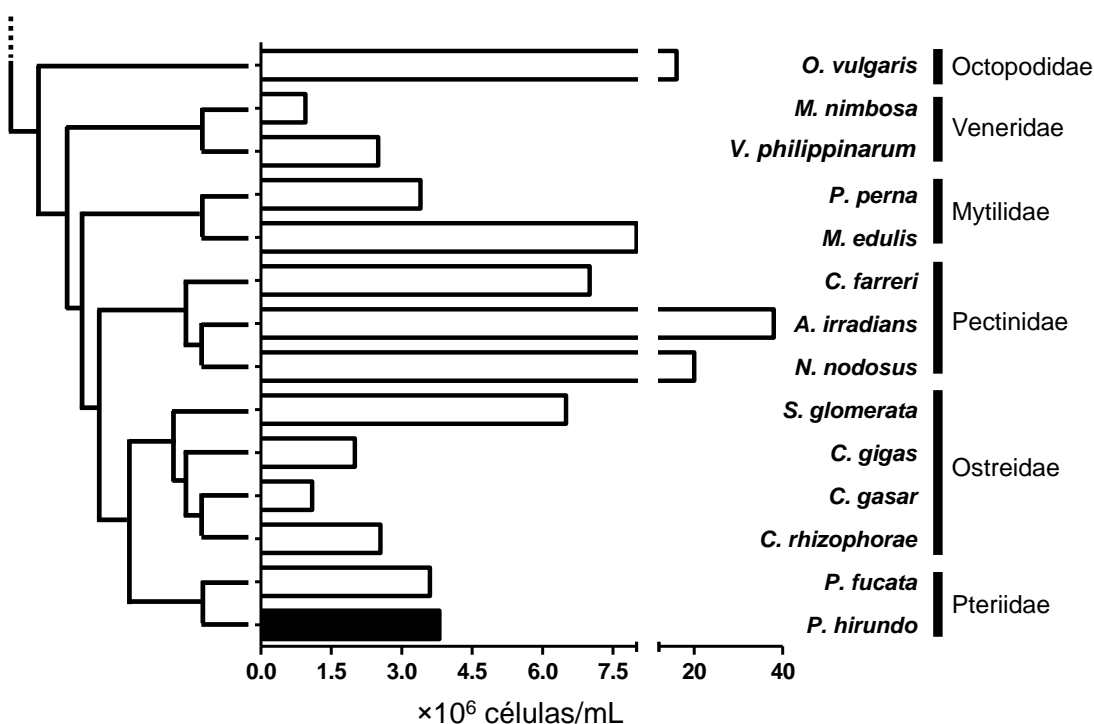
Significâncias estatísticas ($P < 0,05$) entre os dados de THC e DHC dos diferentes grupos experimentais foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos hemócitos da perlífera *P. hirundo*

Para compreender o sistema imune de um invertebrado, é de extrema importância que se identifique e caracterize suas células imunocompetentes, as quais se encontram presentes na hemolinfa. Através das metodologias empregadas neste trabalho, foi possível identificar, caracterizar e quantificar os hemócitos circulantes da perlífera nativa *P. hirundo*. Os hemócitos identificados são semelhantes aos hemócitos de outros moluscos bivalves, encontrando-se na concentração de $3,57 \pm 1,87 \times 10^6$ células por mL de hemolinfa (**Figura 3**).

Figura 3. Número de hemócitos circulantes na hemolinfa de diferentes espécies de moluscos. O nome das espécies (com a indicação das famílias) está representado à direita: *Pteria hirundo*, *Pinctada fucata* (Dang et al., 2012), *Crassostrea rhizophorae* (Barth et al., 2003), *C. gasar* (Queiroga et al., 2013), *C. gigas* (Zhang et al., 2014), *Saccostrea glomerata* (Dang et al., 2014), *Nodipecten nodosus* (Schleder et al., 2008), *Argopecten irradians* (Zhang et al., 2006), *Chlamys farreri* (Liu et al., 2004), *Mytilus edulis* (Coles et al., 1995), *Perna perna* (Barracco et al., 1999), *Venerupis (Ruditapes) philippinarum* (Oubella et al., 1996), *Macrocallista nimbosa* (Jauzein et al., 2013) e *Octopus vulgaris* (Castellanos-Martínez et al., 2014). O dendograma à esquerda indica a relação filogenética entre as espécies (Plazzi et al., 2011).

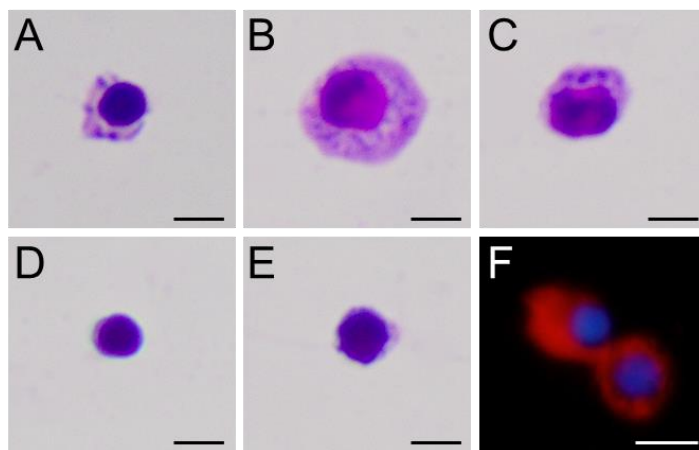


O número de hemócitos circulantes na hemolinfa de *P. hirundo* assemelha-se ao encontrado na hemolinfa da ostra perlífera *Pinctada fucata* ($3,62 \times 10^6$ hemócitos/mL), outro membro pertencente à família Pteriidae (Dang et al., 2012) (**Figura 3**). Além dessa espécie, foram encontradas semelhanças no número total de hemócitos com os bivalves nativos *Crassostrea rhizophorae* ($2,55 \times 10^6$ hemócitos/mL) e *Perna perna* ($3,40 \times 10^6$ hemócitos/mL) e com o venerídeo *Venerupis (Ruditapes) philippinarum* ($2,5 \times 10^6$ hemócitos/mL) (Barth et al., 2003; Barracco et al., 1999; Oubella et al., 1996).

Durante as análises foram identificados dois tipos celulares básicos na hemolinfa: hemócitos granulares (HG) e hemócitos hialinos (HH) (**Figura 4**). Os hemócitos granulares (HG) da espécie *P. hirundo* caracterizam-se pela presença de poucos grânulos no citoplasma. Essas células possuem um tamanho variado (6-12 μm) e apresentam-se predominantemente nas formas esférica e ovalada. Alguns poucos HG foram encontrados na forma alongada. Quando observados em microscopia de fase, os grânulos destacam-se em relação ao núcleo e ao citoplasma, por apresentar uma coloração mais escura e não refringente.

Os HG representam a população mais abundante de *P. hirundo* (78 % dos hemócitos presentes na hemolinfa), assim como observado na ostra *C. rhizophorae* (82 %) (Barth et al., 2003) e no polvo *Octopus vulgaris* (82 %) (Castellanos-Martínez et al., 2014). Geralmente, os grânulos dos HG de outras espécies de invertebrados marinhos, como ostras, mexilhões e camarões mostram-se bastante refringentes em microscopia de contraste de fase (Barracco et al., 2008; Barracco & da Silva, 2008). Através da coloração de Giemsa, observou-se a presença de grânulos de diferentes tamanhos distribuídos em células com citoplasma mais restrito ou abundante (**Figura 4**).

Figura 4. Hemócitos circulantes presentes na hemolinfa da ostra perlífera *Pteria hirundo*. (A-C) Hemócitos granulares e (D-E) hemócitos hialinos corados com Giemsa. (F) Núcleo dos hemócitos marcados na cor azul com o intercalante DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) e citoesqueleto (actina-F) marcado na cor vermelha com faloidina conjugada com *Alexa Fluor*[®] 568. A barra corresponde a 5 μ m.



Os hemócitos hialinos (HH) de *P. hirundo* caracterizam-se pela ausência total de grânulos citoplasmáticos. Os HH (5-9 μ m) são células menores em relação aos HG e apresentam-se unicamente nas formas esférica e ovalada. Os HH apresentam uma proporção maior entre núcleo/citoplasma (quando comparado aos HG), onde o núcleo ocupa grande parte do citoplasma. Tais células representam 22 % dos hemócitos circulantes de *P. hirundo*.

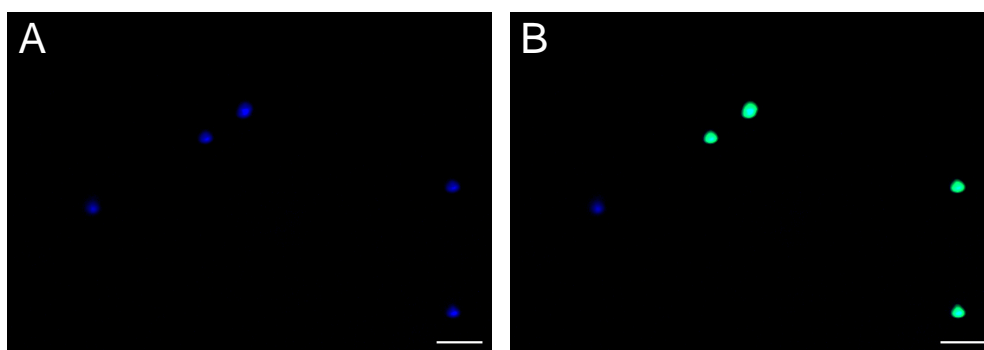
As diferentes subpopulações de hemócitos presentes na hemolinfa estão diretamente relacionadas à imunidade dos moluscos bivalves (Schmitt et al., 2012). Os HG parecem ser, de modo geral, as células mais ativas nas respostas imunológicas de moluscos. Embora sua composição e função possam variar consideravelmente, essas células são capazes de fagocitar ativamente microrganismos, gerar ERO e ERN e sintetizar proteínas de reconhecimento padrão, enzimas digestivas e PAM (Schmitt et al., 2012; Barracco & da Silva, 2008). Segundo Vargas-Abores e Barracco (2001), os HH, por outro lado, parecem ter uma participação mais secundária nas respostas de defesa.

4.2. Os hemócitos de *P. hirundo* possuem capacidade fagocítica

Quando o hospedeiro é invadido por microrganismos, os hemócitos migram massivamente através dos tecidos para os sítios de infecção, gerando uma resposta imunológica (Rosa et al., 2011). Nesses sítios, as células circulantes da hemolinfa possuem a capacidade envolver, interiorizar e degradar microrganismos. Nesse contexto, uma importante pergunta deste trabalho foi avaliar se as células presentes na hemolinfa de *P. hirundo* são capazes de fagocitar agentes invasores.

Através de ensaios *in vitro* com microesferas fluorescentes de látex (2 µm de diâmetro), foi possível confirmar que grande parte dessas células, apresentam capacidade fagocítica (**Figura 5**), assim como descrito em outras espécies de invertebrados (Barracco et al., 2008; Bachère et al., 2004). Tais resultados sugerem que os hemócitos de *P. hirundo* participem no reconhecimento e interiorização de microrganismos invasores para a sua posterior eliminação. Contudo, para melhor caracterizar a capacidade fagocítica dos hemócitos dessa espécie, faz-se necessário a realização de estudos com diferentes tipos de microrganismos e determinação dos tipos celulares envolvidos, uma vez que foi observado que nem todos hemócitos foram capazes de fagocitar as microesferas.

Figura 5. Ensaio de fagocitose dos hemócitos de *Pteria hirundo* com microesferas de látex fluorescentes. (A) A coloração em azul corresponde ao núcleo dos hemócitos marcados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). (B) A coloração em verde corresponde às microesferas de látex fluorescentes (2 µm de diâmetro) fagocitadas pelos hemócitos. A barra corresponde a 5 µm.



4.3. Peptídeos antimicrobianos do tipo CSαβ (mitilinas e defensinas)

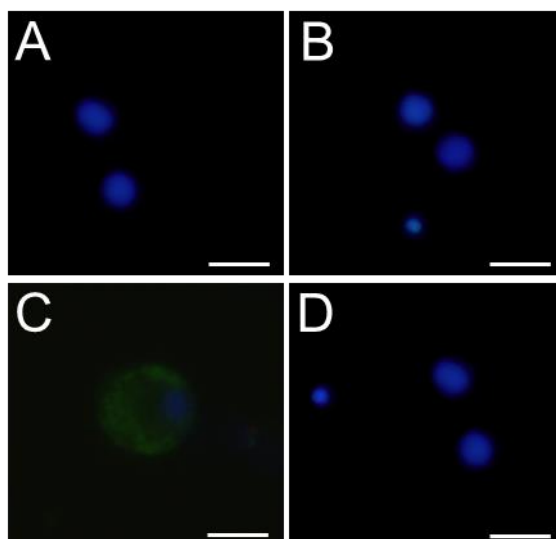
parecem não estar presentes nos hemócitos de *P. hirundo*

Proteínas e peptídeos antimicrobianos (PAM) são um dos efetores da imunidade inata mais conservados ao longo da evolução (Mitta et al., 2000). Essas moléculas apresentam uma grande diversidade estrutural e biológica, podendo apresentar uma atividade antimicrobiana rápida e potente contra um amplo espectro de microrganismos (Guaní-Guerra et al., 2010). Em moluscos bivalves, diferentes famílias de PAM têm sido isoladas e caracterizadas, entre elas as defensinas (Charlet et al. 1996; Hubert et al., 1996), mitilinas (Mitta et al., 2000), miticinas (Mitta et al., 1999), mitimicinas (Sonthi et al., 2012), mitimacinas (Gerdol et al., 2012), big defensinas (Rosa et al., 2011), peptídeos ricos em prolina/arginina (Gueguen et al., 2009) e a proteína bactericida indutora de permeabilidade (Gonzalez et al., 2007).

Através da técnica de imunofluorescência indireta utilizando anti-mitilina de *M. galloprovincialis*, não foi possível detectar a presença de mitilinas nos hemócitos de *P. hirundo* (**Figura 6**). Devido a sua similaridade estrutural com as defensinas (Figura 2), as mitilinas foram detectadas nos grânulos dos hemócitos da ostra *C. gigas* (**Figura 6**). Ambos peptídeos apresentam uma estrutura do tipo CS α β , estabilizada por quatro pontes intramoleculares de dissulfeto (Schmitt et al., 2012; Roch et al., 2008). A aparente ausência de peptídeos do tipo CS α β (mitilinas e defensinas) nos hemócitos de *P. hirundo* não é um indicativo da inexistência de PAM nessa espécie. Até o momento, este é o primeiro relato sobre a detecção de PAM em pterídeos. Assim, seria de grande importância estudos de identificação e caracterização de novas famílias de PAM nessa família de moluscos bivalves.

Figura 6. Detecção de mitilinas nos hemócitos da perlífera nativa *Pteria hirundo* por imunofluorescência indireta. (A) Hemócitos de *P. hirundo* e da (C) ostra *Crassostrea gigas*

incubados com anticorpos policlonais anti-mitilina B de *Mytilus galloprovincialis*. Os controles negativos foram realizados na ausência dos anticorpos primários em preparações de hemócitos de (B) *P. hirundo* e (D) *C. gigas*. A coloração em verde corresponde à marcação de mitilinas enquanto que a coloração em azul corresponde ao núcleo dos hemócitos marcados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). A barra corresponde a 5 µm.

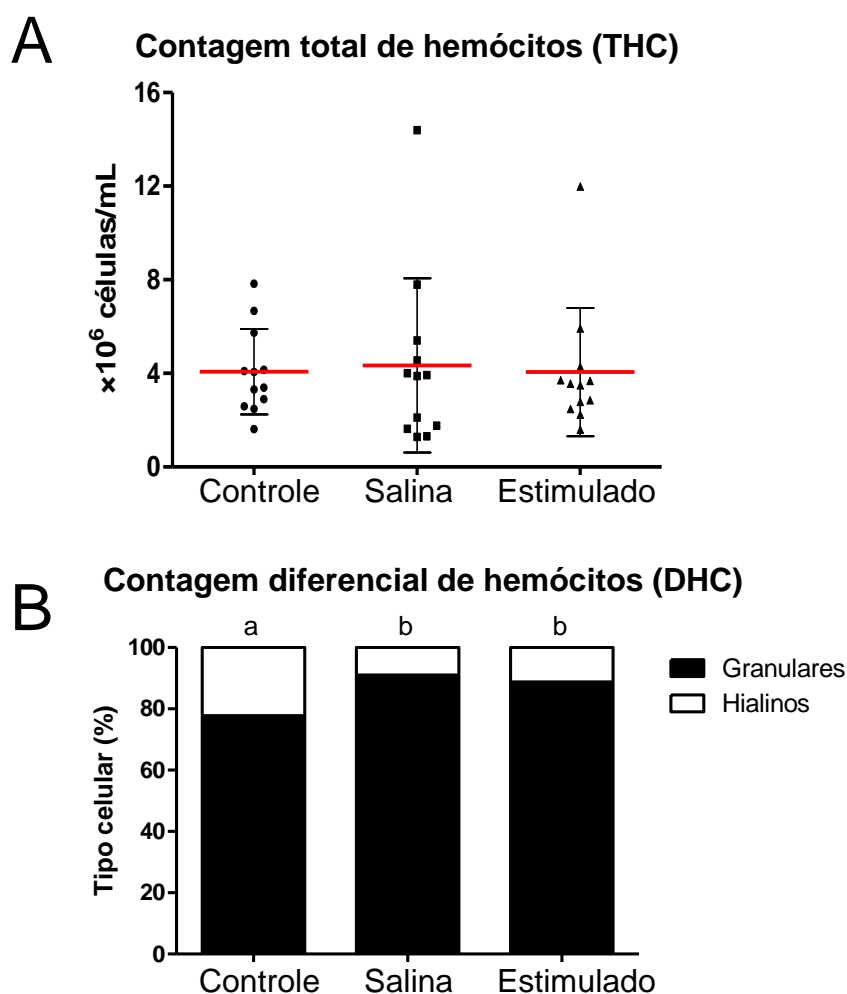


4.4. Resposta dos hemócitos a um estímulo microbiano

A participação dos hemócitos nas respostas de defesa de *P. hirundo* foi avaliada após um estímulo microbiano com a bactéria marinha *V. harveyi*. Após 24 h do estímulo, a contagem total (THC) e diferencial (DHC) dos hemócitos circulantes foi determinada nos diferentes grupos experimentais. O número total de hemócitos nos animais não estimulados foi de $3,57 \pm 1,87 \times 10^6$ células/mL enquanto que nos animais injetados com salina e *V. harveyi* foi de $3,42 \pm 2,04 \times 10^6$ e $3,33 \pm 1,16 \times 10^6$ células/mL, respectivamente (**Figura 7A**). Apesar de não terem sido encontradas diferenças estatísticas no número total de hemócitos, a proporção de HG circulantes nos animais estimulados com *V. harveyi* e com salina foi 15,5 % maior do que em animais não estimulados (**Figura 7B**).

Figura 7. Contagem total (THC) e diferencial (DHC) dos hemócitos de *Pteria hirundo* 24 horas

após a injeção de PBS-salina (grupo Salina) ou após a injeção de uma solução contendo bactérias *Vibrio harveyi* ATCC 14126 mortas por calor (grupo Estimulado). Animais não-injetados foram utilizados como grupo Controle. (A) Os pontos representam a THC dos diferentes indivíduos (n=12) de cada grupo experimental e as linhas em vermelho a média. (B) As barras representam a média da porcentagem de hemócitos granulares (preto) e hialinos (branco) de cada grupo experimental. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre as condições experimentais ($P<0,05$), obtidas através dos testes ANOVA e Tukey.



O aumento no número de HG nos animais estimulados (com bactérias ou salina) pode estar associado à produção de novos hemócitos ou à diferenciação de hemócitos indiferenciados (os quais alguns foram descritos como hialinos) em hemócitos granulares. Além disso, durante os estímulos, algumas populações de hemócitos podem ter migrado para os sítios de infecção, como relatado em ostras da espécie *C. gigas* (Schmitt et al., 2012; Rosa et al., 2011).

5. CONCLUSÕES

- Os hemócitos de *P. hirundo* assemelham-se aos encontrados em outras espécies de moluscos e encontram-se na concentração de $3,57 \times 10^6$ células por mL de hemolinfa;
- Na hemolinfa dessa perlífera nativa estão presentes dois tipos principais de hemócitos: hemócitos granulares (HG) e hemócitos hialinos (HH);
- Os hemócitos de *P. hirundo* são capazes de fagocitar microesferas de látex fluorescentes de 2 μm de diâmetro;
- Não foi diagnosticada a presença de peptídeos antimicrobianos do tipo CS $\alpha\beta$ (mitilinas e defensinas) nos hemócitos desses animais através da metodologia empregada;
- Após 24 h de um estímulo microbiano ou injúria, a proporção de HG circulantes foi 15,5 % maior do que em animais não estimulados.

O estudo sobre a imunidade de moluscos bivalves é motivada pela necessidade de entender como ocorre a interação desses animais com o seu ambiente e com os microrganismos comensais e patogênicos a eles associados. Dessa forma, é de extrema importância compreender o sistema imunológico de animais cultiváveis para o desenvolvimento de ferramentas e técnicas mais aplicadas que possam auxiliar no manejo e produção dessas espécies.

Dentro dessa problemática, o presente trabalho mostrou um estudo inicial a cerca do sistema imunológico da perlífera nativa *P. hirundo*, que possui um grande potencial para a aquicultura em virtude de sua capacidade de produzir pérolas e ainda ser utilizada para o consumo humano. Devido a interessantes características zootécnicas (Albuquerque et al., 2012), essa espécie poderá ser uma nova opção de cultivo no estado de Santa Catarina. Tendo em vista futuros cultivos, o presente estudo poderá colaborar para uma maior compreensão dos aspectos imunológicos dessa espécie, podendo fornecer subsídios importantes para a prevenção e controle de enfermidades nos cultivos.

REFERÊNCIAS

- Abbott RT. **American Seashells**. New York: Van Nostrand Reinhold, 587 p, 1974.
- Adhya M, Jeung HD, Kang HS, Choi KS, Lee DS, Cho M. Cloning and localization of MCdef, a defensin from Manila clams (*Ruditapes philippinarum*). **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 161, p. 25-31, 2012.
- Albuquerque MCP. **Novas opções de cultivo de moluscos bivalves marinhos no Brasil: *Pteria hirundo* (Linnaeus, 1758) e *Cyrtopleura costata* (Linnaeus, 1758)** [tese] / Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque; orientador: Jaime Fernando Ferreira – Florianópolis, SC, 2010. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. 218 p. 2010.
- Albuquerque MCP, Alves R, Zanandrea A, Ferreira J, Melo C, Magalhães A. Growth and survival of the pearl oyster *Pteria hirundo* (L., 1758) in an intermediate stage of culture in Santa Catarina, Brazil. **Brazilian J Biol**, v. 72, p. 175-180, 2012.
- Alves R. **Biologia de *Pteria hirundo*, ostra perlífera do Brasil** [tese] / Rafael Alves; orientadora: Aimê Rachel Magenta Magalhães – Florianópolis, SC, 2010. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. 163 p. 2010.
- Bachère E, Gueguen Y, Gonzalez M, de Lorgeril J, Garnier J, Romestand B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunol Rev**, v. 198, p. 149-168, 2004.
- Barracco MA, da Silva PM. Hemolinfa e sistema imune. In: C R, Weber L, Conceição M, eds. **O Mexilhão *Perna perna* (L.): Biologia, Ecologia e Aplicações**. Rio de Janeiro: Interciência; p. 85-103, 2008.
- Barracco MA, Medeiros ID, Moreira FM. Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 9, p. 387-404, 1999.
- Barracco MA, Perazzolo LM, Rosa RD. Inmunologia del camarón. In: Morales V, Cuéllar-Anjel J, eds. **Guía Práctica de Patología E Inmunología de Camarones Penaeidos**. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei; p. 169-224, 2008.
- Barth T, Moraes N, Barracco MA. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* of different habitats of Santa Catarina Island, Brazil. **Aquat Living Resour**, v. 18, p. 179-186, 2005.
- Beçak W, Paulete J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos. v 1, 327 p, 1956.
- Castellanos-Martínez S, Prado-Alvarez M, Lobo-da-Cunha A, Azevedo C, Gestal C. Morphologic, cytometric and functional characterization of the common octopus (*Octopus vulgaris*) hemocytes. **Dev Comp Immunol**, v. 44, p. 50-58, 2014.
- Charlet M, Chernysh S, Philippe H, Hetru C, Hoffmann JA, Bulet P. Innate immunity: Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. **J Biol Chem**, v. 271, p. 21808-21813, 1996.

- Cheng T. Invertebrate blood cells. *In*: Ratcliffe N, Rowley A, eds. **Invertebrate Blood Cells**. New York: Academic Press, p. 233-301, 1981.
- Dang C, Tan T, Moffit D, Deboutteville JD, Barnes AC. Gender differences in hemocyte immune parameters of bivalves: the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* and the pearl oyster *Pinctada fucata*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 33, p. 138-142, 2012.
- Duperthuy M, Binesse J, Le Roux F, Romestand B, Caro A, Got P, Givaudan A, Mazel D, Bachère E, Destoumieux-Garzón D. The major outer membrane protein OmpU of *Vibrio splendidus* contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster *Crassostrea gigas*. **Environ Microbiol**, v. 12, p. 951-963, 2010.
- FAO – **Food and Agriculture Organization**. Fisheries and Aquaculture Department, Newsletter, 2012.
- Fassler R. Farming jewels, new developments in pearl farming. **World Aquacult**, v. 26, p. 5-10, 1995.
- Gerdol M, De Moro G, Manfrin C, Venier P, Pallavicini A. Big defensins and mytimacins, new AMP families of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Dev Comp Immunol**, v. 36, p. 390-399, 2012.
- Gonzalez M, Gueguen Y, Destoumieux-Garzón D, Romestand B, Fievet J, Pugnière M, Roquet F, Escoubas JM, Vandenbulcke F, Levy O, Sauné L, Bulet P, Bachère E. Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, p. 17759-17764, 2007.
- Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terán LM. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. **Clin Immunol**, v. 135, p. 1-11, 2010.
- Gueguen Y, Herpin A, Aumelas A, Garnier J, Fievet J, Escoubas JM, Bulet P, Gonzalez M, Lelong C, Favrel P, Bachère E. Characterization of a defensin from the oyster *Crassostrea gigas*: Recombinant production, folding, solution structure, antimicrobial activities, and gene expression. **J Biol Chem**, v. 281, p. 313-323, 2006.
- Gueguen Y, Romestand B, Fievet J, Schmitt P, Destoumieux-Garzón D, Vandenbulcke F, Bulet P, Bachère E. Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin. **Mol Immunol**, v. 46, p. 516-522, 2009.
- Hine P. The inter-relationships of bivalve haemocytes. **Fish Shellfish Immunol**, v. 9, p. 367-385, 1999.
- Hubert F, Noel T, Roch P. A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). **Eur J Biochem**, v. 240, p. 302-306, 1996.
- Jauzein C, Donaghy L, Volety AK. Flow cytometric characterization of hemocytes of the sunray venus clam *Macrocallista nimbosa* and influence of salinity variation. **Fish Shellfish Immunol**. 2013 Sep;35(3):716-24.
- Li H, Parisi MG, Parrinello N, Cammarata M, Roch P. Molluscan antimicrobial peptides, a review from activity-based evidences to computer-assisted sequences. **Invertebr Surviv J**, v. 8, p. 85-97, 2011.

- Liu S, Jiang X, Hu X, Gong J, Hwang H, Mai K. Effects of temperature on non-specific immune parameters in two Scallop species: *Argopecten irradians* (Lamarck 1819) and *Chlamys farreri* (Jones & Preston 1904). **Aquacult Res**, v. 35, p. 678-682, 2004.
- Mitta G, Hubert F, Noel T, Roch P. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Eur J Biochem**, v. 265, p. 71-78, 1999.
- Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F, Salzet M, Roch P. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. **J Biol Chem**, v. 275, p. 12954-12962, 2000.
- MPA – **Ministério da Pesca e da Aquicultura**. Boletim Estatístico da Pesca, 2011.
- Nagai K. A history of the cultured pearl industry. **Zoolog Sci**, v. 30, p. 783-793, 2013.
- Oubella R, Maes P, Bassem A, Paillard C, Auffret M. Selective induction of hemocytic response in *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia) by different species of *Vibrio* (Bacteria). **Aquat Living Resour**, v. 9, p. 137-143, 1996.
- Plazzi F, Ceregato A, Taviani M, Passamonti M. A molecular phylogeny of bivalve mollusks: ancient radiations and divergences as revealed by mitochondrial genes. **PLoS One**, v. 6: e27147, 2011.
- Queiroga FR, Marques-Santos LF, Hégaret H, Soudant P, Farias ND, Schlindwein AD, Mirella da Silva P. Immunological responses of the mangrove oysters *Crassostrea gasar* naturally infected by *Perkinsus* sp. in the Mamanguape Estuary, Paraíba state (Northeastern, Brazil). **Fish Shellfish Immunol**, v. 35, p. 319-327, 2013.
- Ren Q, Li M, Zhang CY, Chen KP. Six defensins from the triangle-shell pearl mussel *Hyriopsis cumingii*. **Fish Shellfish Immunol**, v. 31, p. 1232-1238, 2011.
- Rios EC. **Compendium of Brazilian sea shells**. Rio Grande: Evangraf, 668 p, 2009.
- Roch P, Yang Y, Toubiana M, Aumelas A. NMR structure of mussel mytilin, and antiviral-antibacterial activities of derived synthetic peptides. **Dev Comp Immunol**, v. 32, p. 227-238, 2008.
- Rosa RD, Barracco MA. Antimicrobial peptides in crustaceans. **Invertebr Surviv J**, v. 7, p. 262-284, 2010.
- Rosa RD, Santini A, Fievet J, Bulet P, Destoumieux-Garzón D, Bachère E. Big defensins, a diverse family of antimicrobial peptides that follows different patterns of expression in hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. **PLoS One**, v. 6: e25594, 2011.
- Schleder DD, Kayser M, Sühnel S, Ferreira JF, Rupp GS, Barracco MA. Evaluation of hemato-immunological parameters during the reproductive cycle of the scallop *Nodipecten nodosus* in association with a carotenoid-enriched diet. **Aquaculture**, v. 280, p. 256-263, 2008.
- Schmitt P, Rosa RD, Duperthuy M, de Lorget J, Bachère E, Destoumieux-Garzón D. The antimicrobial defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: how diversity may compensate for scarcity in the regulation of resident/pathogenic microflora. **Front Microbiol**, v. 3: e160, 2012.

- Seo JK, Crawford JM, Stone KL, Noga EJ. Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 338, p. 1998-2004, 2005.
- Sonthi M, Cantet F, Toubiana M, Trapani MR, Parisi MG, Cammarata M, Roch P. Gene expression specificity of the mussel antifungal mytimycin (MytM). **Fish Shellfish Immunol**, v. 32, p. 45-50, 2012.
- Urban HJ. Culture potential of the Caribbean pearl oyster (*Pinctada imbricata*) from the Caribbean. II. Spat collection, growth and mortality in culture systems. **Aquaculture**, v. 189, p. 375-388, 2000.
- Vargas-Albores F, Barracco MA. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos. In: Maeda-Martinez A, ed. **Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia Y Acuicultura**. Ciudad de Mexico: Limusa; p. 127-146, 2001.
- Xu W, Faisal M. Defensin of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): molecular structure, *in vitro* expression, antimicrobial activity, and potential functions. **Mol Immunol**, v. 47, p. 2138-2147, 2010.
- Yount NY, Bayer AS, Xiong YQ, Yeaman MR. Advances in antimicrobial peptide immunobiology. **Biopolymers**, v. 84, p. 435-458, 2006.
- Zhang T, Qiu L, Sun Z, Wang L, Zhou Z, Liu R, Yue F, Sun R, Song L. The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. **Dev Comp Immunol**, v. 45, p. 141-150, 2014.
- Zhang W, Wu X., Wang M. Morphological, structural, and functional characterization of the haemocytes of the scallop, *Argopecten irradians*. **Aquaculture**, v. 251, p. 19-32, 2006.